



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>7</sup> :</b> <b>A61L 15/32, C08H 1/06</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/32246</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 8 juin 2000 (08.06.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR99/02746 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 9 novembre 1999 (09.11.99) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 98/15072 30 novembre 1998 (30.11.98) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> IMEDEX BIOMATERIAUX [FR/FR]; Zone industrielle Les Troques, F-69630 Chaponost (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BAYON, Yves [FR/FR]; 81, rue Alexandre Boutin, F-69100 Villeurbanne (FR). GRAVAGNA, Philippe [FR/FR]; 23, Grande Rue, F-69540 Irigny (FR). TAYOT, Jean-Louis [FR/FR]; 1, rue des Greffières, F-69890 La Tour de Salvagny (FR). <b>(74) Mandataire:</b> MONCHENY, Michel; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PREPARING A COLLAGEN MATERIAL WITH CONTROLLED IN VIVO DEGRADATION <b>(54) Titre:</b> PREPARATION D'UN MATERIAU COLLAGENIQUE AVEC UNE DEGRADATION IN VIVO CONTROLEE <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a method for preparing a non-toxic, sterile, biocompatible, crosslinked collagen material with controlled in vivo biodegradation speed. It consists in subjecting a collagen constituent, either to beta radiation, or to gamma radiation. The collagen material obtained is biodegradable in a few days depending on the type of irradiation used.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention a pour objet un procédé pour la préparation d'un matériau collagénique réticulé, biocompatible, stérile, non toxique et à vitesse de biodégradation in vivo contrôlée. Il comprend le fait de soumettre un composant collagénique à l'état humide, soit à une irradiation par rayonnement bêta, soit à une irradiation par rayonnement gamma. Le matériau collagénique obtenu est biodégradable en quelques jours à plusieurs semaines selon le type d'irradiation mis en oeuvre.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LJ	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## PREPARATION D'UN MATERIAU COLLAGENIQUE AVEC UNE DEGRADATION IN VIVO CONTROLEE

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un  
5 matériau collagénique, permettant de contrôler la vitesse de biodégradation in vivo de ce matériau.

Elle est plus précisément relative à un procédé de traitement d'un  
composant collagénique permettant d'obtenir des matériaux de stabilité et de  
propriétés mécaniques variables selon les conditions dudit traitement, adaptés  
10 aux diverses applications biomédicales du collagène.

Les biomatériaux à base de collagène sont actuellement utilisés  
dans de multiples applications en présentant comme avantage majeur d'être  
résorbables. Cependant, selon leurs applications, il est nécessaire de contrôler  
leur dégradation biologique. En effet, les propriétés mécaniques du matériau  
15 collagénique implanté doivent progressivement diminuer et ledit matériau doit  
être finalement entièrement digéré sur une période déterminée.

Selon les applications de ces biomatériaux à base de collagène, la  
dégradation de ce dernier doit en général intervenir en un temps allant de  
quelques jours à plusieurs semaines.

20 Pour atteindre ces objectifs, les propriétés du collagène peuvent  
être modifiées de plusieurs façons possibles. On connaît ainsi dans la  
technique, des traitements conduisant à la formation de liaisons ioniques, de  
liaisons hydrogènes ou encore de liaisons covalentes (Chvapil et al., in  
International Review of Connective Tissue Research, Vol. 6, Eds. D.A. Hall and  
25 D.S. Jackson, Academic Press, UK, 1973, 1-61).

La création de liens intermoléculaires permet d'augmenter le  
temps de biodégradation du matériau collagénique et la résistance mécanique  
des fibres de collagène tout en diminuant la capacité d'absorption d'eau, la  
solubilité et la vitesse de dégradation enzymatique de ces dernières (Pachence  
30 et al., Medical Device & Diagnostic Industry, 1987, 9, 46-55).

On a ainsi proposé dans la technique des procédés permettant de  
réticuler le collagène soit par des méthodes physiques soit par des méthodes  
chimiques.

Les méthodes chimiques font appel à des agents réticulants comme des composés aldéhydiques parmi lesquels on peut citer en particulier le formaldéhyde, le glutaraldéhyde, le succinaldéhyde, le glyoxal et l'acroléine ou encore les carbodiimides, les diisocyanates et les dérivés azide (Pachence et al., Medical Device & Diagnostic Industry, 1987, 9, 46-55 ; Weadock et al., Biomat. Med. Dev. Art. Org., 1983-84, 11, 293-318 ; BIOETICA et INSERM, FR 2 617 855).

Les composés aldéhydiques sont certes les agents réticulants les plus utilisés mais ils génèrent des biomatériaux potentiellement cytotoxiques.

10 Il est souhaitable d'introduire le moins possible de produits chimiques dans un biomatériau implantable, car ces additifs engendrent des complications et contraintes réglementaires de plus en plus lourdes pour démontrer l'absence de toxicité de tels produits.

On connaît par ailleurs dans la technique, un procédé pour 15 modifier le collagène en formant des fonctions aldéhydes au sein même de celui-ci, par coupure oxydative à l'acide periodique ou l'un de ses sels, ce traitement permettant la réticulation du collagène à pH neutre ou basique (M. Tardy et J.L. Tayot, US 4 931 546).

Enfin, il a également été proposé dans la technique de modifier les 20 propriétés du collagène en fonctionnalisant les groupes amino et carboxyles des amino-acides qu'il contient. Selon cette approche, des modifications de charge et de polarité peuvent ainsi ralentir ou accélérer la dégradation du collagène (Green et al., Biochem. J., 1953, 154, 181-187 ; Gustavson, Ark. Kemi., 1961, 55, 541-546).

25 Les méthodes physiques comprennent quant à elles la déshydratation, le vieillissement, le chauffage en absence d'humidité ou encore l'irradiation par les rayons ultraviolets, par rayonnement bêta ou gamma.

Parmi ceux-ci, le traitement par irradiation au rayonnement bêta ou gamma est utilisé pour stériliser les matériaux collagéniques deshydratés. 30 mais conduit à des matériaux dont la résistance est difficilement prédictible à la lumière de la littérature existante.

Les différents paramètres pouvant intervenir dans ce type de traitement ne sont pas connus de manière suffisante pour permettre de

contrôler la qualité des biomatériaux collagéniques résultants, en particulier du point de vue de leur résistance mécanique et de leur vitesse de biodégradation (Sintzel et al., Drug Dev. Ind. Pharm., 1997, 23, 857-878).

Le brevet US 5,035,715 décrit une irradiation par rayonnement gamma d'un mélange sensiblement non humide de collagène et d'un matériau minéral, ce qui permet d'obtenir une certaine réticulation.

Le brevet EP 0 351 296 décrit une irradiation gamma de billes de collagène permettant d'augmenter leur densité.

La demande WO 95/34332 décrit la stérilisation d'une prothèse valvulaire d'origine tissulaire porcine, contenant donc du collagène, par un faisceau d'électrons ou encore par irradiation X ou gamma. L'irradiation électronique de type bêta de la prothèse préalablement légèrement réticulée par un agent chimique entraîne une dégradation moindre que l'irradiation gamma. Ce document n'enseigne pas qu'il est possible d'accroître la réticulation et la résistance à la dégradation d'une telle valve par rayonnement bêta. Au contraire il enseigne que le rayonnement bêta n'a guère d'influence sur la réticulation.

Le brevet US 5,674,290 décrit la stérilisation par irradiation gamma d'implants collagéniques ayant une teneur en eau élevée, dans une enveloppe étanche et transparente au rayonnement gamma. Lorsque cet enseignement est appliqué au collagène, le collagène est préalablement réticulé par un agent chimique. Ce document constate que, contrairement à la stérilisation par irradiation gamma d'un matériau collagénique sec, la stérilisation par rayonnement gamma du matériau collagénique humide ne modifie que très légèrement la dégradabilité enzymatique du matériau. Le document suggère, de façon erronée, que la stérilisation d'un tel matériau par faisceau d'électrons serait équivalente à la stérilisation par irradiation par stérilisation gamma.

On constate donc que les divers traitements que l'on connaît dans la technique permettant d'agir sur certaines propriétés des matériaux collagéniques, sont soit à l'origine de toxicités indésirables ou potentielles dans les applications envisagées, ou encore difficiles ou coûteux à mettre en œuvre.

ou ne permettent pas de contrôler efficacement les propriétés du matériau final obtenu.

La présente invention a pour objectif de fournir un traitement permettant d'obtenir des matériaux collagéniques dont la vitesse de  
5 dégradation in vivo et les propriétés mécaniques sont modulables suivant les applications potentielles desdits matériaux.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un procédé de traitement conduisant à un biomatériau prêt à l'emploi, en procédant simultanément à la réticulation et à la stérilisation du matériau collagénique.

10 A cette fin, la présente invention a pour objet un procédé pour la préparation d'un matériau collagénique réticulé, biocompatible, non toxique et à vitesse de biodégradation in vivo contrôlée, caractérisé en ce qu'il comprend le fait de soumettre un composant collagénique à l'état humide à une irradiation par rayonnement bêta, le matériau collagénique obtenu étant stérile et  
15 biodégradable en quelques jours à plusieurs semaines.

L'invention a aussi pour objet le procédé précité caractérisé en ce que le composant collagénique à l'état humide est associé à un réseau de fibres de collagène de préférence de structure hélicoïdale, préalablement à son irradiation.

20 L'invention concerne aussi les matériaux obtenus par le procédé ci-dessus.

Elle concerne encore un matériau bicomposite qui est biocompatible, non-toxique et stérile, à vitesse de biodégradation in vivo contrôlée, suturable ou agrafable, caractérisé en ce qu'il comprend uniquement  
25 ou principalement, deux couches intimement associées et réticulées avec interpénétration des réseaux réticulés, l'une desdites couches étant formée d'un film à base d'un composant collagénique réticulé et l'autre d'une compresse tassée formée de fibres de collagène réticulé rendues insolubles, notamment de collagène de structure hélicoïdale, préparées à partir de collagène solubilisé  
30 ou dispersé dans une solution aqueuse.

Les inventeurs ont découvert de manière tout à fait surprenante et imprévisible, que les propriétés de matériaux collagéniques dépendent du mode d'irradiation bêta ou gamma du rayonnement.

Ils ont découvert en particulier que le taux d'hydratation du matériau irradié joue lui-même un rôle décisif dans les propriétés finales du matériau collagénique résultant.

Ils ont en effet observé que les résultats obtenus sont nettement  
5 différents suivant la nature du composant collagénique traité et suivant les conditions de stérilisation par irradiation appliquées.

Les inventeurs ont ainsi mis en évidence un traitement permettant à la fois la réticulation et la structuration du composant collagénique traité, simultanément à sa stérilisation, conduisant, à partir d'un matériau humide  
10 sensiblement dépourvu d'agent complémentaire de réticulation et, de préférence, non réticulé, à un matériau prêt à l'emploi à propriétés définies, en particulier du point de vue de sa résistance mécanique et de son temps de dégradation in vivo.

Selon l'invention, le terme "structuration" du composant  
15 collagénique se rapporte à la balance entre le taux de réticulation et le taux d'hydrolyse dudit composant collagénique qui conduit à des biomatériaux plus ou moins résistants.

Selon l'invention, la nature du composant collagénique se réfère en particulier à son état (taux d'humidité), son pH ou encore sa  
20 fonctionnalisation, le cas échéant.

Le composant collagénique mis en œuvre dans le procédé de l'invention se trouve à l'état humide. Par état humide, on entend une matière présentant un taux d'humidité supérieur à 30 %, plus préférentiellement compris entre 40 et 95 %.

25 A titre comparatif, l'état sec correspond quant à lui à une matière dont le taux d'humidité est inférieur à 30 %, celui-ci étant de préférence compris entre 5 et 20 %.

Dans ce cas, celui-ci peut se présenter, à l'état humide, sous la forme d'un gel ou d'une solution aqueuse, ou à l'état partiellement deshydraté.  
30 sous la forme d'un film, le taux d'humidité étant dans ce dernier cas voisin de 30 % à la différence des gels et solutions qui contiennent une beaucoup plus grande quantité d'eau.

Quelle que soit sa forme, la concentration en composant collagénique (matière sèche) est au minimum de 0,5 %, celle-ci étant de préférence supérieure à 2,5 %.

Le composant collagénique utilisé aux fins de l'invention peut  
5 consister en ou comprendre du collagène indifféremment d'origine animale ou humaine ou obtenu par des moyens de recombinaison génétique. On utilise de préférence du collagène natif, solubilisé à pH acide ou encore tel qu'obtenu après traitement par digestion à la pepsine. Il peut s'agir en particulier de collagène bovin de type I ou de collagènes humains de type I ou III ou encore  
10 de mélanges en toutes proportions de ces derniers.

Le composant collagénique peut également consister en ou comprendre du collagène modifié par coupure oxydative, notamment à l'aide d'acide periodique ou l'un de ses sels selon la technique précitée.

On rappelle brièvement que cette technique consiste à soumettre  
15 une solution acide de collagène à l'action de l'acide periodique ou l'un de ses sels par mélange avec une solution de cet acide ou sel à une concentration comprise entre 1 et  $10^{-5}$  M, de préférence entre  $5 \cdot 10^{-3}$  M et  $10^{-1}$  M à une température voisine de la température ambiante, pendant une durée pouvant aller de 10 minutes à 72 heures.

20 Selon l'invention, on utilise une solution aqueuse acide de collagène dont la concentration est comprise entre 5 et 50 g/l, celle-ci étant de préférence de 30 g/l.

Ce traitement provoque des coupures dans certains constituants du collagène qui sont l'hydroxylysine et les sucres et crée ainsi des sites  
25 réactifs sans en provoquer la réticulation tant que le pH reste acide.

La coupure oxydative du collagène a comme fonction de permettre une réticulation modérée ultérieure du matériau collagénique mais l'invention n'exclut pas que l'on puisse réaliser cette fonction par d'autres  
30 moyens de réticulation modérée, par exemple par rayonnement bêta ou gamma, ou d'autres agents de réticulation modérée, par exemple des agents chimiques à des doses suffisamment faibles et non toxiques.

Le composant collagénique mis en œuvre selon l'invention peut encore consister en ou comprendre du collagène ayant perdu, au moins



partiellement, sa structure hélicoïdale, notamment par chauffage à une température supérieure à 37°C, de préférence comprise entre 40 et 50°C pendant moins d'une heure.

On peut obtenir notamment une préparation finale que l'on peut assimiler à de la gélatine mais dont le poids moléculaire des chaînes élémentaires est supérieur ou égal à 100 kDa.

Le traitement par chauffage à température supérieure à 37°C de la solution de collagène entraîne la perte progressive de la structure hélicoïdale du collagène, mais l'invention n'exclut pas que l'on puisse réaliser cette fonction par d'autres moyens physiques ou chimiques, par exemple par ultra-sonication, ou par addition d'agents chaotropiques.

Le composant collagénique peut aussi être formé de ou comprendre du collagène fonctionnalisé au niveau des fonctions amino et/ou carboxyle des amino-acides par exemple par succinylation, méthylation ou encore par greffage d'acides gras, ou toute autre méthode connue pour modifier chimiquement le collagène.

L'invention s'applique également à des mélanges en toutes proportions des différents composants collagéniques précités.

Le composant collagénique selon l'invention peut également contenir un additif hydrophile macromoléculaire.

Conformément à la présente invention, l'additif hydrophile macromoléculaire présente un poids moléculaire avantageusement supérieur à 3 000 daltons.

Il peut s'agir de polymères hydrophiles de synthèse, avantageusement de poids moléculaire compris entre 3 000 et 20 000 daltons. Le polyéthylène glycol est particulièrement préféré.

Il peut s'agir également de polysaccharides, parmi lesquels on peut citer l'amidon, le dextrane et la cellulose qui sont préférés.

On peut également prévoir l'utilisation de tels polysaccharides sous forme oxydée faisant apparaître des fonctions carboxyliques dans ces molécules.

Les mucopolysaccharides peuvent également convenir aux fins de l'invention mais ne sont pas préférés car leur origine animale particulière les

rend difficiles à préparer en satisfaisant aux normes réglementaires de traçabilité.

L'additif hydrophile est sélectionné en fonction de divers paramètres liés notamment à son application, comme son prix, son innocuité, sa biodégradabilité et/ou sa facilité d'élimination, notamment par voie rénale, en cas d'application thérapeutique.

La concentration en additif hydrophile est de 2 à 10 fois inférieure à celle du composant collagénique.

On décrit plus précisément ci-après le procédé de préparation d'un matériau collagénique selon la présente invention.

Celui-ci comprend une étape selon laquelle le composant collagénique tel que défini ci-dessus, est soumis à une irradiation par rayonnement bêta de doses variables selon la résistance mécanique du biomatériau final souhaitée ainsi que sa vitesse de biodégradation in vivo.

Le composant collagénique est avantageusement traité à pH neutre, de préférence compris entre 6,5 et 8 dans le but de favoriser les réactions de réticulation et d'obtenir un biomatériau biocompatible grâce au pH physiologique.

Le composant collagénique est réticulé/structuré par irradiation aux rayons bêta à des doses stérilisantes, avantageusement de l'ordre de 5 à 50 KGrey, de préférence comprise entre 25 et 35 KGrey.

Dans certaines conditions, les doses peuvent être réduites, par exemple jusqu'à 5 KGrey pour des matériaux déjà stériles ou très peu contaminés, ce qui permet de moduler à la baisse le degré de réticulation.

Conformément à l'invention, le traitement par irradiation bêta appliquée à un composant collagénique à l'état humide permet d'obtenir un matériau présentant une forte résistance à la dégradation qui est ainsi biodégradable in vivo en plusieurs semaines alors qu'une exposition à un rayonnement gamma, conduit à un biomatériau conduisant à une faible résistance à la dégradation qui sera ainsi biodégradable in vivo en quelques jours.

Ces résultats sont inverses de ceux obtenus pour un composant collagénique à l'état sec pour lequel une irradiation au rayonnement bêta

conduit à un biomatériau dont la dégradation sera obtenue en quelques jours alors que l'irradiation gamma conduit à un biomatériau dont la dégradation sera obtenue en plusieurs semaines.

5 Selon une variante de réalisation de l'invention, le composant collagénique destiné à être structuré par irradiation est associé au préalable à un réseau de fibres de collagène non dénaturé qui est avantageusement mis sous forme d'une compresse tassée.

La préparation de cette compresse peut être réalisée à partir de collagène natif, oxydé à l'aide d'acide périodique ou l'un de ses sels.

10 Des fibres sont formées à partir de la solution résultante qui sont ensuite réticulées par neutralisation.

Les fibres de collagène oxydé, de structure hélicoïdale, ainsi réticulées sont lyophilisées et deshydratées puis tassées pour former la compresse.

15 On dépose ensuite sur cette compresse tassée de collagène fibreux, une solution de composant collagénique préparée comme indiquée précédemment.

L'ensemble est avantageusement séché et partiellement réhydraté pour augmenter la concentration en composant collagénique.

20 On procède ensuite au traitement par irradiation comme décrit ci-dessus.

On obtient ainsi la structuration/réticulation de l'ensemble précité conduisant à un matériau bicomposite comprenant une couche formant film à base d'un composant collagénique réticulé associée à une compresse tassée  
25 de fibres de collagène réticulé avec interpénétration des réseaux réticulés.

D'une manière générale, ce procédé peut être appliqué à des compresses de fibres tissées ou non tissées, de collagène avantageusement de structure hélicoïdale.

30 Les matériaux collagéniques obtenus par le procédé de l'invention sont utiles pour la prévention des adhérences post-opératoires et/ou la cicatrisation de plaies.

De tels matériaux sont particulièrement utiles pour favoriser la cicatrisation des plaies cutanées et des plaies chirurgicales. Leur nature

biocompatible les rend très facilement colonisables par les cellules des différents tissus au contact desquels ils sont appliqués.

Dans le cas des plaies internes, il a été observé que cette cicatrisation s'effectue de manière harmonieuse sans entraîner de proliférations  
5 tissulaires fibreuses anarchiques responsables d'adhérences post-opératoires.

L'activité cicatrisante de ces matériaux peut évidemment être renforcée par l'addition de facteurs de croissance ou de différenciation cellulaires.

Les matériaux selon l'invention sont donc recommandés pour  
10 assurer rapidement une cicatrisation de qualité, aussi proche que possible de l'anatomie initiale.

Les matériaux collagéniques associés à un réseau de fibres de collagène sont également utiles pour la cicatrisation de plaies comme indiqué auparavant. Ils présentent l'avantage d'être suturables et agrafables compte  
15 tenu de leur résistance très élevée résultant de l'irradiation aux rayonnements béta.

Ces matériaux peuvent également être utilisés pour le remplacement de tissus ou parois (par exemple paroi œsophagienne, intestinale...) ou pour le comblement de ceux-ci (en cas d'ablation partielle  
20 d'une partie de tissu ou paroi).

## **EXEMPLES**

### **EXEMPLE 1 : Structuration d'un gel de collagène chauffé.**

25 Une solution acide de collagène bovin de type I, à la concentration de 16 %, est préparée en solubilisant la poudre acide de collagène dans de l'eau ultrafiltrée déminéralisée, à une température comprise entre 40 et 60°C. pendant une durée inférieure à 30 minutes. La solution est neutralisée jusqu'à pH 7,45 par addition de soude normale, dès que la solution de collagène est  
30 suffisamment fluide, soit 5 à 10 minutes après l'addition de collagène dans l'eau, pour éviter l'hydrolyse du collagène.

La solution de collagène est ensuite filtrée stérilement sur une membrane de porosité 0,22 µm et conservée à une température comprise entre 0 et 10°C, avant son utilisation.

On obtient une préparation finale que l'on peut assimiler à de la  
5 gélatine, mais dont le poids moléculaire des chaînes élémentaires est supérieur ou égal à environ 100 kDa.

D'autres sources de collagène, connues de l'homme de l'art, peuvent être utilisées pour obtenir du collagène chauffé comme décrit ci-dessus dans cet exemple.

10 Dans le cas du collagène bovin de type I, il peut être acido-soluble (extrait à partir de peaux ou de tendons à pH acide), ou solubilisé par digestion avec la pepsine, qui facilite les filtrations stérilisantes ultérieures du collagène chauffé.

La solution de collagène chauffé obtenue est ensuite mise en  
15 forme par moulage, "prilling" (formation de billes par passage dans des capillaires et recueillement des gouttes), séchage partiel (qui permet d'augmenter la concentration en composant collagénique), ou tout autre procédé à une température comprise entre 40 et 70°C, puis refroidie à une température comprise entre 0 et 25°C.

20 Ces traitements ont pour but d'obtenir des biomatériaux de toutes formes, adaptées aux applications recherchées, comme par exemple des tubes capillaires, des billes, microbilles, capsules, films, pouvant contenir des molécules d'intérêt thérapeutique.

Le biomatériau préparé est réticulé et stérilisé soit par irradiation  
25 gamma soit par irradiation bêta, à la dose de 25 à 35 KGy.

Le biomatériau irradié par les rayonnements gamma se dissout dans l'eau déminéralisée, à 37°C, en moins de 24 heures.

Par contre, le traitement par irradiation bêta réticule fortement le biomatériau. Celui-ci ne se dégrade pas à 60°C, dans l'eau déminéralisée.  
30 même après une journée. Sa capacité d'absorption d'eau est réduite, voire nulle. Elle est inférieure à 10 % du poids du biomatériau. Sa biodégradation est lente in vivo, et nécessite plusieurs semaines lorsque le site d'implantation du biomatériau, chez l'animal, est sous-cutané ou au contact des viscères.

Selon une variante, ce matériau peut être préparé à partir d'une solution de collagène natif de concentration comprise entre 0,5 et 3 %, contenant 5 g/l de NaCl et non soumise à l'étape de chauffage, de manière à préserver la structure hélicoïdale du collagène.

5

**EXEMPLE 2 : Structuration d'un film de collagène partiellement réhydraté.**

Le matériau de l'exemple 1 est préparé sous forme de film d'épaisseur 2 mm, sans aucun additif chimique.

Avant l'étape de traitement final par irradiation, le film obtenu est  
10 deshydraté sous un flux d'air sec et filtré pendant 24 heures.

Le film sec obtenu est ensuite réhydraté pendant 5 à 10 minutes dans de l'eau distillée.

Le film partiellement réhydraté est conditionné dans un emballage étanche à la vapeur d'eau, puis soumis au traitement par irradiation bêta ou  
15 gamma à une dose de 25 à 35 kiloGrey.

Le film obtenu en final mesure entre 0,5 et 1 mm d'épaisseur en fonction du temps de réhydratation précédemment appliqué. Sa teneur en collagène est comprise entre 30 et 60 %.

Le matériau stérilisé par irradiation bêta est très résistant à des  
20 forces d'étirement et se dégrade in vivo, par voie sous-cutanée, en plus de 3 semaines.

Le matériau stérilisé par irradiation gamma est peu résistant à des forces d'étirement, gonfle spontanément au contact de l'eau à 37°C et se dégrade in vivo après implantation en moins d'une semaine.

25 En variante, ce matériau peut être préparé à partir d'une solution de collagène natif de concentration comprise entre 0,5 et 3 %, contenant 5 g/l de NaCl et non soumise à l'étape de chauffage, de manière à préserver la structure hélicoïdale du collagène.

**EXEMPLE 3 : Réalisation d'un matériau suturable par association du matériau collagénique de l'exemple 2 à un réseau de fibres de collagène de structure hélicoïdale.**

a) Préparation du réseau de fibres de collagène.

5 On prépare une solution acide de collagène bovin de type I à la concentration de 1 % en solubilisant la poudre acide dans de l'eau ultrafiltrée, déminéralisée à 20°C.

Cette solution est additionnée d'acide orthopériodique, à l'abri de la lumière, afin d'obtenir une concentration finale de  $5 \times 10^{-3}$  M en vue de  
10 préparer des fibres de collagène oxydé, conformément au brevet FR 2 601 371.

Après 2 heures de traitement, cette solution est injectée dans une série de capillaires parallèles, de diamètre intérieur voisin de 300 microns, qui produisent ainsi des tubes fins de collagène, coupés par unités de 4 cm de longueur, grâce à un dispositif de section automatique. Ces fins capillaires de  
15 collagène sont recueillis en vrac dans une solution tampon alcaline de carbonate de sodium 0,05 M à pH 9,3, additionnée d'éthanol à 30 %.

Dans ces conditions, le collagène oxydé se réticule immédiatement et les tubes de collagène deviennent insolubles. Les tubes ainsi réticulés sont lavés dans des bains successifs d'eau ultrafiltrée. Une  
20 suspension de ces fibres est ensuite réalisée contenant 2 % de matière sèche collagénique, additionnée de glycérine à 1 % et étalée en plaques d'épaisseur 5 mm.

Les plaques sont ensuite lyophilisées et les compresses deshydratées sont tassées par pression, pour obtenir une épaisseur de 1 à  
25 2 mm.

b) Préparation de la solution de collagène chauffée.

On réalise une solution de collagène à 5 % chauffée dans les conditions décrites de l'exemple 1 ou 2.

c) Association des deux matériaux précédents.

30 La solution préparée en "b)" est coulée sur la compresse tassée décrite au paragraphe "a)", à une dose de 0,2 ml/cm<sup>2</sup> environ.

L'ensemble est ensuite séché sous flux laminaire stérile pendant 24 heures.

Le matériau composite est ensuite partiellement réhydraté par trempage en eau, pendant 10 minutes.

Le matériau est conditionné dans un emballage étanche à la vapeur d'eau et stérilisé par irradiation bêta (faisceau d'électrons accélérés).

5 On obtient un matériau extrêmement résistant à l'étirement, dont les propriétés mécaniques le rendent utilisable avec les techniques chirurgicales de suture et d'agrafage.

Ce matériau est constitué uniquement de collagène, sans aucun additif chimique. Il est non toxique, parfaitement toléré par l'organisme et peut  
10 être utilisé comme substitut des tissus animaux, actuellement utilisés par les chirurgiens (fascia lata, dure mère, etc.) dans les applications de remplacement ou de comblement de tissus, parois... ou encore de cicatrisation.

**EXEMPLE 4 : Structuration d'hydrocolloïdes collagéniques constitués de**  
15 **fibres de collagène natif oxydé.**

Les hydrocolloïdes collagéniques sont réalisés à partir de collagène bovin natif, non digéré par la pepsine, et oxydé par l'acide periodique, suivant le procédé décrit dans le brevet US 4 931 546.

On emploie des fibres de collagène natif de type I extrait de peaux  
20 de jeunes veaux. D'autres sources de collagène, connues de l'homme de l'art, peuvent être utilisées.

Une solution de collagène est préparée à 30 g/l par mise en suspension en HCl 0,01 N, dans un volume de 720 ml. Elle est additionnée d'acide periodique à la concentration finale de 8 mM, soit 1,83 g/l.

25 L'oxydation est effectuée à une température de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , pendant  $3 \text{ h} \pm 30$  minutes, sous agitation et à l'abri de la lumière.

Puis, le collagène oxydé est précipité en ajoutant du NaCl 240 g/l, jusqu'à obtenir une concentration finale en NaCl de 41 g/l.

Après 30 minutes d'attente, le précipité est récolté par décantation  
30 à travers un tamis de toile de porosité comprise entre 20 et 100  $\mu\text{m}$ , puis lavé 4 fois avec une solution de NaCl 41 g/l en HCl 0,01 N pour éliminer toutes traces d'acide periodique ou de ses dérivés formés au cours de l'oxydation du collagène. On obtient un précipité de 110 g.



Puis, le chlorure de sodium est éliminé par trois lavages successifs du précipité salin de collagène, en utilisant un mélange acétone/eau (80/20, m/m).

Un lavage final en acétone 100 % permet d'obtenir 51,5 g d'un précipité acétonique, concentré, de collagène oxydé acide, non réticulé et dépourvu de produits toxiques, dus à l'emploi de l'acide periodique.

Le précipité acétonique est repris dans 390 ml d'eau déminéralisée ultrafiltrée (apyrogène) à 40°C pendant 5 à 10 minutes, pour obtenir une concentration en collagène de 4,1 %. Puis, le mélange est chauffé 30 minutes à  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ .

Avant utilisation, la solution de collagène chauffé oxydé peut être conservée à  $-20^\circ\text{C}$ .

Pour la réalisation de l'hydrocolloïde, le collagène oxydé chauffé, comme préparé ci-dessus, à la concentration finale de 4,1 % est additionné, à 38°C, d'une solution stérile de PEG 4000 (polyéthylène glycol de poids moléculaire de 4 000) pour atteindre la concentration finale de 1,3 % de PEG et de 3,9 % en collagène total. Le pH de cette solution est ensuite neutralisé à 7,3.

Le mélange de collagène est coulé dans des supports hydrophobes, en polystyrène ou PVC, à raison de 0,2 g par  $\text{cm}^2$ . Il est évaporé, sous flux d'air stérile, pendant 18 à 24 heures, à une température voisine de  $22^\circ\text{C}$ . Le film résultant est réhydraté pendant 15 à 20 minutes dans de l'eau déminéralisée apyrogène, pour obtenir un hydrocolloïde. Ce biomatériau est structuré et stérilisé par irradiation au rayonnement bêta ou gamma, à une dose comprise entre 25 et 35 KGy. Son humidité, avant stérilisation est comprise de préférence entre 75 et 95 %.

Les hydrocolloïdes structurés par irradiation au rayonnement gamma se délitent en moins de 24 heures, à  $37^\circ\text{C}$ , lorsqu'ils sont plongés dans de l'eau déminéralisée apyrogène.

Par contre, l'irradiation bêta, aux doses mentionnées ci-dessus, permet d'obtenir un hydrocolloïde plus résistant qui garde son intégrité, même après avoir été plongé dans de l'eau déminéralisée apyrogène, à  $37^\circ\text{C}$ , pendant 24 heures.

**EXEMPLE 5 : Structuration d'hydrocolloïdes collagéniques constitués de fibres de collagène natif non oxydé.**

Les hydrocolloïdes décrits dans cet exemple représentent une variante de l'exemple 4.

5 Ils sont préparés à partir de collagène chauffé non oxydé et de PEG 4000 comme additif hydrophile macromoléculaire.

On reprend du collagène I bovin natif acide, à la concentration finale de 3 %, dans de l'eau déminéralisée ultrafiltrée contenant 1 % de PEG 4000. Le mélange est maintenu à 42°C, sous agitation, jusqu'à obtenir une  
10 solution homogène, c'est-à-dire en moins de 30 minutes. Puis, il est dégazé sous vide.

Ce mélange est, ensuite, coulé dans des supports hydrophobes, en polystyrène ou PVC, à raison de 0,27 g par cm<sup>2</sup>.

Il est séché, sous flux d'air stérile, pendant 18 à 24 heures.

15 Le film résultant est réhydraté, pendant 15 à 20 minutes, dans un tampon physiologique, afin d'obtenir un film de pH neutre, compris entre 7 et 8. On peut utiliser à cet effet un tampon phosphate 150 mM, de pH 8,2.

Ce biomatériau est structuré et stérilisé par irradiation au rayonnement bêta ou gamma, à une dose comprise entre 25 et 35 KGy. Son  
20 humidité, avant stérilisation est comprise de préférence entre 75 et 95 %.

Les propriétés des matériaux obtenus sont comparables aux matériaux décrits dans les exemples précédents. La stérilisation par irradiation bêta rend plus résistant l'hydrocolloïde à base de collagène I bovin natif non oxydé que la stérilisation par irradiation gamma.

25

**EXEMPLE 6 : Structuration d'hydrocolloïdes collagéniques constitués de collagène I bovin pepsiné oxydé.**

Les hydrocolloïdes décrits dans cet exemple représentent une variante des exemples 4 et 5.

30 On utilise du collagène I bovin pepsiné. On peut, de la même manière, utiliser des collagènes humains de type I ou III, ou leur mélange en toutes proportions.

Le collagène est oxydé comme décrit dans l'exemple 4 avec les modifications suivantes :

Le précipité acétonique de collagène oxydé est repris à la concentration finale de 3 %, dans de l'eau déminéralisée ultrafiltrée, à 40°C. Il est ensuite chauffé à 50°C, pendant 30 minutes. La solution de collagène chauffé oxydé est stérilisée par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm, dans une étuve à 40°C.

A la température de 38°C, on ajoute au collagène oxydé comme préparé ci-dessus du PEG 4000 en solution aqueuse à 20 %, pour atteindre la concentration finale de PEG de 1 %. Le mélange est neutralisé jusqu'à un pH de 7,0, avec de la soude 0,5 N et 0,1 N. Il est ensuite réparti dans des supports hydrophobes, en polystyrène ou PVC, à raison de 0,27 g par cm<sup>2</sup>.

Il est séché, sous flux d'air stérile, pendant 18 à 24 heures, à une température voisine de 22°C. Puis, il est réhydraté dans de l'eau déminéralisée ultrafiltrée.

Ce biomatériau est structuré et stérilisé par irradiation au rayonnement bêta ou gamma, à une dose comprise entre 25 et 35 KGy.

Son humidité, avant stérilisation, est comprise de préférence entre 75 et 95 %.

Comme pour les exemples précédents, réalisés à partir de biomatériaux humides, l'irradiation bêta permet d'obtenir des matériaux plus résistants que l'irradiation gamma.

**EXEMPLE 7 : Structuration d'hydrocolloïdes collagéniques constitués de collagène de type I, pepsiné, chauffé, non oxydé.**

Les hydrocolloïdes décrits dans cet exemple représentent une variante des exemples 4, 5 et 6.

Les hydrocolloïdes collagéniques sont réalisés à partir de collagène bovin natif de type I, digéré par la pepsine et chauffé.

On peut, de la même manière, utiliser des collagènes chauffés humains de type I, III ou leur mélange en toutes proportions.

On emploie une solution de collagène chauffé à 3 % et neutralisé, à pH 7,45, préparé suivant l'exemple 1.

On ajoute, à 42°C, au collagène chauffé à 3 %, une solution stérile concentrée de PEG 4000 pour obtenir une concentration finale de 0,9 % en PEG et de 2,7 % de collagène. Le pH de la solution est ajusté à 7,0, par addition d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium.

5 Ce mélange est ensuite coulé dans des supports hydrophobes, en polystyrène ou PVC, à raison de 0,27 g par cm<sup>2</sup>.

Il est séché, sous flux d'air stérile, pendant 18 à 24 heures, à une température voisine de 22°C.

10 Le film résultant est réhydraté, pendant 15 à 20 minutes, dans de l'eau déminéralisée ultrafiltrée.

Ce biomatériau est structuré et stérilisé par irradiation bêta ou gamma, à une dose comprise entre 25 et 35 KGy.

Son humidité, avant stérilisation, est comprise de préférence entre 75 et 95 %.

15 Comme pour les exemples précédents, réalisés à partir de biomatériaux humides, la gamma-irradiation permet d'obtenir des matériaux moins résistants que l'irradiation bêta.

#### **EXEMPLE COMPARATIF : Structuration d'un film de collagène sec.**

20 On réalise un film de collagène comme décrit dans la demande de brevet FR 9711589.

On emploie du collagène oxydé chauffé, préparé suivant l'exemple 6 [7].

25 Le collagène utilisé comme matière première pour la préparation du collagène oxydé chauffé est du collagène bovin de type I, éventuellement solubilisé par digestion à la pepsine et, purifié par des précipitations salines, selon les techniques déjà décrites. On peut utiliser, de la même manière, des collagènes humains de type I ou III ou leur mélange en toutes proportions.

30 Une solution de collagène chauffé oxydé à 3 % est additionnée à 35°C, d'une solution stérile concentrée de PEG 4000 et de glycérine, pour obtenir une concentration finale de 0,9 % en PEG, de 0,54 % en glycérine et de 2,7 % en collagène total. Le pH de la solution est ajusté à 7,0, par addition d'une solution concentrée d'hydroxyde de sodium.

Cette solution est coulée en couche mince à densité de 0,133 g/cm<sup>2</sup> sur un support plan hydrophobe de type PVC ou polystyrène. Le film est séché sous flux d'air stérile, à une température voisine de 22°C.

L'épaisseur moyenne du film obtenu est de 40 à 50 µm, avec un  
5 taux moyen d'humidité de 10 %.

Le film sec est irradié par rayonnement bêta ou gamma à une dose comprise entre 25 et 35 KGy.

Dans ce cas, le film sec irradié par rayonnement gamma présente des propriétés mécaniques supérieures au film irradié par rayonnement bêta  
10 comme l'indique le taux de gonflement, plus faible des films traités par les rayons gamma. Parallèlement, la biodégradation du film sec traité par les rayons gamma, in vivo, est supérieure à 3 semaines. Par contre, le film sec irradié par rayonnement bêta est "digéré" in vivo en moins d'une semaine.

Mode irradiation	Résistance à la	
	dégradation, en milieu acide (pH 2), à 37°C	Biodégradation in vivo
<b>Béta 25-35 KGy</b>		
(faisceau d'électrons accélérés)		
Etat sec	faible	quelques jours
Etat humide	forte	plusieurs semaines
<b>Gamma 25-35 KGy</b>		
(source radioactive)		
Etat sec	forte	plusieurs semaines
Etat humide	faible	quelques jours

## REVENDEICATIONS

1. Procédé pour la préparation d'un matériau collagénique réticulé, biocompatible, non toxique et à vitesse de biodégradation in vivo contrôlée, caractérisé en ce qu'il comprend le fait de soumettre un composant collagénique sensiblement dépourvu d'agent complémentaire de réticulation, et de préférence non réticulé, à l'état humide à une irradiation par rayonnement bêta, le matériau collagénique obtenu étant stérile et biodégradable en quelques jours à plusieurs semaines.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le composé collagénique présente un taux d'humidité supérieur à 30 %, de préférence supérieur à 40 %.

3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le composant collagénique est sous forme d'un gel.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le composant collagénique est sous forme d'une solution aqueuse.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique présente un pH neutre, de préférence compris entre 6,5 et 8.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration en composant collagénique (matière sèche) est de 0,5 % au minimum et de préférence supérieure à 2,5 %.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique consiste en ou comprend du collagène ayant perdu au moins partiellement sa structure hélicoïdale.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le collagène ayant perdu au moins partiellement sa structure hélicoïdale est formé de collagène non hydrolysé, constitué majoritairement de chaînes  $\alpha$ .

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 et 8, caractérisé en ce que le composant collagénique consiste en ou comprend du collagène ayant perdu au moins partiellement sa structure hélicoïdale par chauffage au-dessus de 37°C, de préférence comprise entre 40 et 50°C.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le composant collagénique consiste en ou comprend du collagène oxydé.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le  
5 collagène oxydé consiste en du collagène modifié par coupure oxydative à l'aide d'acide periodique ou l'un de ses sels.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le composant collagénique comprend du collagène fonctionnalisé au niveau des fonctions amino et/ou carboxyle des amino-acides.

10 13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique comprend un additif hydrophile macromoléculaire.

14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que  
15 l'additif hydrophile macromoléculaire présente un poids moléculaire supérieur à 3 000 Daltons.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 et 14, caractérisé en ce que l'additif hydrophile macromoléculaire est un polymère hydrophile de poids moléculaire compris entre 3 000 et 20 000 Daltons.

16. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à  
20 15, caractérisé en ce que l'additif hydrophile macromoléculaire est le polyéthylèneglycol.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 13 à 16, caractérisé en ce que l'additif hydrophile macromoléculaire est choisi parmi les polysaccharides notamment l'amidon, le dextrane ou la cellulose, ou les  
25 mucopolysaccharides.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'additif hydrophile macromoléculaire est un polysaccharide sous forme oxydée.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique est irradié à une  
30 dose de 5 à 50 KGy.

20. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique est irradié à une dose de 20 à 50 KGy, de préférence 25 à 35 KGy

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique est irradié par rayonnement bêta, le matériau collagénique résultant étant fortement réticulé et biodégradable in vivo en plusieurs semaines.

5 22. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le composant collagénique à l'état humide est associé à un réseau de fibres de collagène de préférence de structure hélicoïdale, préalablement à son irradiation.

10 23. Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le réseau de fibres de collagène consiste en une compresse de fibres tassées obtenue à partir d'une solution acide de collagène natif, par traitement à l'aide d'acide périodique ou l'un de ses sels, formation de fibres puis réticulation par neutralisation, les fibres de collagènes de structure hélicoïdale réticulées résultantes étant tassées sous pression, et en ce qu'on dépose une solution de  
15 composant collagénique sur ladite compresse puis en ce que l'ensemble est irradié aux rayonnements bêta.

24. Matériau collagénique bicomposite qui est biocompatible, non-toxique et stérile, à vitesse de biodégradation in vivo contrôlée, suturable ou agrafable, caractérisé en ce qu'il comprend uniquement ou principalement,  
20 deux couches intimement associées et réticulées avec interpénétration des réseaux réticulés, l'une desdites couches étant formée d'un film à base d'un composant collagénique réticulé et l'autre d'une compresse tassée formée de fibres de collagène réticulé rendues insolubles, notamment de collagène de structure hélicoïdale, préparées à partir de collagène solubilisé ou dispersé  
25 dans une solution aqueuse.

25. Matériau collagénique bicomposite selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il est réticulé par le procédé selon l'une quelconque des revendications 22 et 23.

30 26. Matériau collagénique selon l'une quelconque des revendications 24 et 25, caractérisé en ce que le composant collagénique est tel que défini selon l'une quelconque des revendications 7 à 18.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 7 A61L15/32 C08H1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 A61L C08H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 035 715 A (SMESTAD THOMAS L ET AL) 30 July 1991 (1991-07-30) cited in the application column 2, line 24,25,43-46 -column 3, line 36-57 column 4, line 55-60 -column 5, line 21-30 column 7, line 59-68 -column 8, line 25-35 column 9, line 12-42	1,4,7
A	EP 0 351 296 A (IMEDEX ;MERIEUX INST (FR)) 17 January 1990 (1990-01-17) cited in the application  abstract column 2, line 11-15 -column 3, line 1-9 column 5, line 1-7,40-48 -column 6, line 1,2  ----- -/-	1,4,5, 10,11, 13,17, 18,24

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 February 2000

Date of mailing of the international search report

22/02/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Böhm, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 99/02746

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 681 869 A (SIMON GABRIEL ET AL) 28 October 1997 (1997-10-28)  abstract column 1, line 14-23, 38-40 -column 4, line 17, 18, 47-51  —	1, 3, 13, 14, 16, 19, 20
A	WO 95 34332 A (ST JUDE MEDICAL) 21 December 1995 (1995-12-21) cited in the application page 1, line 7-11 -page 10-11, line 18-34 page 12, line 1-16 -page 14, line 4-10 page 15, line 1, 2 -page 23, line 17-32; examples 4, 5  —	1, 7, 19, 20
A	US 5 674 290 A (LI SHU-TUNG) 7 October 1997 (1997-10-07) cited in the application column 1, line 28-30, 39, 46-64 -column 3, line 33-36  —	1, 2, 19, 20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 99/02746

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5035715	A	30-07-1991	CA 1320451 A	20-07-1993
			US 4865602 A	12-09-1989
			US 5123925 A	23-06-1992
			AU 603744 B	22-11-1990
			AU 8068087 A	12-05-1988
			DE 3784646 A	15-04-1993
			EP 0270254 A	08-06-1988
			ES 2053562 T	01-08-1994
			GR 3007382 T	30-07-1993
			JP 1882498 C	10-11-1994
			JP 6002151 B	12-01-1994
			JP 63132664 A	04-06-1988
			JP 1901006 C	27-01-1995
			JP 5305133 A	19-11-1993
			JP 6022571 B	30-03-1989
			AT 86505 T	15-03-1993
			CA 1310918 A	01-12-1993
EP 0351296	A	17-01-1990	FR 2634121 A	19-01-1990
			AT 81472 T	15-10-1992
			ES 2044172 T	01-01-1994
			GR 3006072 T	21-06-1993
			JP 2096600 A	09-04-1990
US 5681869	A	28-10-1997	US 5634943 A	03-06-1997
			US 5372580 A	13-12-1994
			US 5090955 A	25-02-1992
			AU 690327 B	23-04-1998
			AU 3413695 A	22-03-1996
			BR 9508696 A	09-09-1997
			CA 2198906 A	07-03-1996
			DE 69514371 D	10-02-2000
			EP 0778858 A	18-06-1997
			JP 10505115 T	19-05-1998
			WO 9606883 A	07-03-1996
			US 5645583 A	08-07-1997
			ZA 9507331 A	15-04-1996
			CA 2089831 A	20-08-1993
			DE 69310569 D	19-06-1997
			DE 69310569 T	18-12-1997
			EP 0557128 A	25-08-1993
			JP 6261923 A	20-09-1994
			US 5607437 A	04-03-1997
			US 5547468 A	20-08-1997
			US 5653725 A	05-08-1997
			US 5931846 A	03-08-1994
WO 9534332	A	21-12-1995	AU 2863495 A	05-01-1996
			BR 9505496 A	12-08-1997
			CA 2169381 A	21-12-1995
			CN 1131913 A	25-09-1996
			EP 0713400 A	29-05-1996
			JP 9502379 T	11-03-1997
			NO 960586 A	08-03-1996
			ZA 9505010 A	08-02-1996
US 5674290	A	07-10-1997	US 5800542 A	01-09-1998



4

5

6

7

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/02746

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 A61L15/32 C08H1/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 A61L C08H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>US 5 035 715 A (SMESTAD THOMAS L ET AL) 30 juillet 1991 (1991-07-30) cité dans la demande colonne 2, ligne 24,25,43-46 -colonne 3, ligne 36-57 colonne 4, ligne 55-60 -colonne 5, ligne 21-30 colonne 7, ligne 59-68 -colonne 8, ligne 25-35 colonne 9, ligne 12-42</p> <p style="text-align: center;">— -/-</p>	1,4,7

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 février 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/02/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3018

Fonctionnaire autorisé

Böhm, I

**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>EP 0 351 296 A (IMEDEX ; MERIEUX INST (FR))            17 janvier 1990 (1990-01-17)            cité dans la demande</p> <p>abrégé            colonne 2, ligne 11-15 -colonne 3, ligne 1-9            colonne 5, ligne 1-7,40-48 -colonne 6, ligne 1,2</p>	1,4,5, 10,11, 13,17, 18,24
A	<p>US 5 681 869 A (SIMON GABRIEL ET AL)            28 octobre 1997 (1997-10-28)</p> <p>abrégé            colonne 1, ligne 14-23,38-40 -colonne 4, ligne 17,18,47-51</p>	1,3,13, 14,16, 19,20
A	<p>WO 95 34332 A (ST JUDE MEDICAL)            21 décembre 1995 (1995-12-21)            cité dans la demande            page 1, ligne 7-11 -page 10-11, ligne 18-34            page 12, ligne 1-16 -page 14, ligne 4-10            page 15, ligne 1,2 -page 23, ligne 17-32;            exemples 4,5</p>	1,7,19, 20
A	<p>US 5 674 290 A (LI SHU-TUNG)            7 octobre 1997 (1997-10-07)            cité dans la demande            colonne 1, ligne 28-30,39,46-64 -colonne 3, ligne 33-36</p>	1,2,19, 20

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. internationale No

PCT/FR 99/02746

Document brevet cité au rapport de recherch	Date d publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5035715 A	30-07-1991	CA 1320451 A	20-07-1993
		US 4865602 A	12-09-1989
		US 5123925 A	23-06-1992
		AU 603744 B	22-11-1990
		AU 8068087 A	12-05-1988
		DE 3784646 A	15-04-1993
		EP 0270254 A	08-06-1988
		ES 2053562 T	01-08-1994
		GR 3007382 T	30-07-1993
		JP 1882498 C	10-11-1994
		JP 6002151 B	12-01-1994
		JP 63132664 A	04-06-1988
		JP 1901006 C	27-01-1995
		JP 5305133 A	19-11-1993
		JP 6022571 B	30-03-1989
		AT 86505 T	15-03-1993
		CA 1310918 A	01-12-1993
EP 0351296 A	17-01-1990	FR 2634121 A	19-01-1990
		AT 81472 T	15-10-1992
		ES 2044172 T	01-01-1994
		GR 3006072 T	21-06-1993
		JP 2096600 A	09-04-1990
US 5681869 A	28-10-1997	US 5634943 A	03-06-1997
		US 5372580 A	13-12-1994
		US 5090955 A	25-02-1992
		AU 690327 B	23-04-1998
		AU 3413695 A	22-03-1996
		BR 9508696 A	09-09-1997
		CA 2198906 A	07-03-1996
		DE 69514371 D	10-02-2000
		EP 0778858 A	18-06-1997
		JP 10505115 T	19-05-1998
		WO 9606883 A	07-03-1996
		US 5645583 A	08-07-1997
		ZA 9507331 A	15-04-1996
		CA 2089831 A	20-08-1993
		DE 69310569 D	19-06-1997
		DE 69310569 T	18-12-1997
		EP 0557128 A	25-08-1993
		JP 6261923 A	20-09-1994
		US 5607437 A	04-03-1997
		US 5547468 A	20-08-1997
		US 5653725 A	05-08-1997
		US 5931846 A	03-08-1994
WO 9534332 A	21-12-1995	AU 2863495 A	05-01-1996
		BR 9505496 A	12-08-1997
		CA 2169381 A	21-12-1995
		CN 1131913 A	25-09-1996
		EP 0713400 A	29-05-1996
		JP 9502379 T	11-03-1997
		NO 960586 A	08-03-1996
US 5674290 A	07-10-1997	ZA 9505010 A	08-02-1996
		US 5800542 A	01-09-1998



.

.

.

.

.

.